Aus der Universitäts-Frauenklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. K. Burger

Quantitative Urineiweißbestimmung mit Invertseifen

Inauguraldissertation

verfaßt und der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der

JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

HELMUT BLANZ
aus Ellwangen/Jagst

WÜRZBURG 1957

Aus der Universitäts-Frauenklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. K. Burger

Quantitative Urineiweißbestimmung mit Invertseifen

Inauguraldissertation

verfaßt und der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der

JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

HELMUT BLANZ
aus Ellwangen/Jagst

WÜRZBURG 1957

Referent: Professor Dr. med. K. Burger

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündl. Prüfung:
22.Februar. 1957.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung 5

II. Literatur-Übersicht 5

III. Material und Methodik 12

IV. Eigene Untersuchungen 16

V. Besprechung der Ergebnisse 22

VI. Zusammenfassung 23

VII. Literatur-Verzeichnis 26

I. EINLEITUNG

Schnell und auch möglichst zuverlässig die im Urin enthaltenen pathologischen Eiweißkörper quantitativ nachzuweisen, ist für Klinik und Praxis gleich wichtig. Diese Arbeit hat daher die Aufgabe, nachzuprüfen, ob sich mit quaternären Ammoniumverbindungen („Invertseifen") die bei den verschiedenen in Frage kommenden Krankheiten wie zum Beispiel bei Schwangerschaftsnephropathie, Präeklampsie und Eklampsie im Harn ausgeschiedenen Eiweißkörper ausreichend sicher und rasch quantitativ erfassen lassen. Es wurde dabei besonders darauf geachtet, ob die verwendete Nachweismethode sowohl in der Klinik als auch vom praktizierenden Arzt ohne besondere Schwierigkeiten ausgeführt werden kann.

Es ist auf verschiedene Weise möglich, Harneiweiß nachzuweisen. Dazu gibt es komplizierte Verfahren, die ausschließlich den großen und gut ausgerüsteten Kliniklaboratorien vorbehalten bleiben müssen, und einfachere, auch für die Praxis geeignete, wie zum Beispiel die klassische Kochprobe, die Sulfosalicylsäuremethode oder die Hellersche Ringprobe.

Quantitative Ergebnisse lassen sich unter anderen mit der modifizierten Kochprobe oder dem Verfahren von *Roberts* und *Stolnikoff*, modifiziert nach *Brandenberg*, erzielen. In Klinik und Praxis werden routinemäßig meist die Sulfosalicylsäureprobe und bei deren positivem Ausfall die nach 24 Stunden abzulesende Albuminimeterbestimmung nach *Esbach* verwendet.

Fast alle Verfahren zur quantitativen Bestimmung pathologischer Eiweißbeimengungen im Harn sind aber entweder nicht ausreichend genau oder kompliziert und zeitraubend. Es wurde daher geprüft, ob der quantitative Harneiweißnachweis mit quaternären Ammoniumverbindungen brauchbar ist und schnell und ohne Schwierigkeiten ausreichend zuverlässige Ergebnisse liefert.

II. LITERATUR-ÜBERSICHT

Schon sehr frühzeitig bemühten sich Ärzte und Naturforscher darum, normale und pathologisch veränderte Harnproben zu untersuchen. Nach *Korányi* widmete bereits Hippokrates eine Studie der Urinuntersuchung und beschrieb zuerst die als „Nubecula" bezeichneten Harntrübungen. Es handelt sich dabei um wolkige Trübungen im unteren Teil einer längere Zeit stehenden Urinsäule, die durch sedimentierte Phosphate, Muzinstoffe oder Harnwegsepithelien entstehen.

Bis zum Ende des 18. Jahrhunderts erschienen rund 200 spezielle Veröffentlichungen *(Lieben)* über Harnuntersuchungen. Es war wohl eine Laune der Natur, die den Hamburger Alchimisten Brand im 17. Jahrhundert den Phosphor entdecken ließ, als er, auf der Suche nach dem „Stein der Weisen", bei der Destillation von Harnrückständen ein eigenartiges grünes Leuchten beobachtete. Mit der Verbesserung der chemischen Untersuchungsmethoden

wuchs auch das Interesse an der Harnanalyse und am Nachweis pathologischer Harneiweißkörper.

Seit der Entdeckung des Italieners Domenico Cotugno im Jahre 1770 ist bekannt, daß unter pathologischen Verhältnissen in der Niere Eiweiß in den Harn übertreten kann. Nachdem rund 60 Jahre später *Bright* 1827 die Systematik der Nierenkrankheiten begründete, erhielt darin die „Albuminurie" ihren festen Platz, ja sie galt sogar lange Zeit als sicherstes und einziges Symptom einer Nierenerkrankung. In der Zwischenzeit hat sich vieles geändert. Grundlegende Auffassungen früherer Zeit, die zweifellos zum Aufbau des gesamten Gebäudes von Nierenkrankheiten, Harnanalyse, Harnproduktion und Eiweißnachweis unerläßlich notwendig waren, wurden revidiert und durch neuere Erkenntnisse ersetzt. Auch die Bewertung des Eiweißgehaltes im Urin ist recht unterschiedlich, und nachdem *J. A. Luetscher* durch elektrophoretische Untersuchungen festgestellt hat, daß neben Albuminen auch Globuline im Harn ausgeschieden werden können, bürgerte sich jetzt ganz allgemein an Stelle von „Albuminurie" die Bezeichnung „Proteinurie" ein.

Von geringen Eiweißspuren abgesehen, ist der Harn des Gesunden praktisch proteinfrei. Nach *B. Minz* enthält der Harn normalerweise 0,2 bis 0,6 Milligrammprozent Eiweiß. Bei diesen geringen Mengen handelt es sich nach Ansicht des Autors um muzinartige oder nukleoalbuminartige Substanzen aus den die Harnwege auskleidenden Schleimhäuten, möglicherweise aber auch um „echte", das heißt durch die Niere ausgeschiedene Eiweißkörper.

Den durchschnittlichen Proteingehalt des Urins gibt *K. H. Mörner* mit 36 Milligramm pro Liter an. Dieser Wert schwankt jedoch zwischen 22 bis 78 Milligramm je Liter Harn. Im Urin sind genügend eiweißfällende Säuren vorhanden, um die doppelte Menge dieses Durchschnittsgehaltes an Eiweißkörpern niederzuschlagen. *Menock* fand mit Hilfe einer immunologischen Nachweismethode als physiologischen Eiweißgehalt Werte zwischen 0,2 bis 0,8 Milligrammprozent.

Sandkühler spricht von einer normalen Proteinausscheidung bei Mengen bis zu 40 Milligramm täglich. Gutartige, vorübergehende Eiweißmehrausscheidungen sind nach *King* und *Gronbeck* häufig.

Die im Urin unter pathologischen Verhältnissen anzutreffenden Eiweißkörper sind nicht einheitlicher Natur *(Sandkühler)*. Es überwiegen jedoch Albumine und Globuline, die auch mit den meisten Nachweismethoden mehr oder weniger genau zu erfassen sind.

Der zur Harnanalyse verwendete Urin soll *(Ruppert)* klar, frei von eiweißhaltigen Verunreinigungen wie zum Beispiel Sputum oder Menstrualblut sein und sauer reagieren. Eine quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration lohnt sich aber erst dann, wenn die empfindliche, vorwiegend qualitative Sulfosalicylsäureprobe eben positiv ausfällt, wenn also mindestens etwa 0,015 Promille Eiweiß vorhanden sind.

Große Proteinbeimengungen im Urin lassen zunächst an eine Nephrose, selten auch einmal an eine Lipoidnephrose oder Amyloidose *(Wollheim)*

denken, die heute mehr als eine allgemeine Eiweißstoffwechselstörung mit Nierenbeteiligung *(Hoff, Rosenstein, Berg* u. a.) aufgefaßt wird, und die neben allgemeinen Ödemen eben durch die meist hochgradige Proteinurie imponiert. Blutdruck und Reststickstoff sind nicht erhöht.

Wesentlich niedrigere Eiweißwerte finden sich bei entzündlichen Prozessen an den Glomeruli, der Glomerulonephritis. Das Harnsediment enthält gelegentlich Zylinder, Lucozyten und Erythrozyten. Die Konzentrationsfähigkeit der Nieren ist eingeschränkt. Im Gegensatz zu vorwiegend tubulären Nierenschädigungen ist jedoch der Blutdruck erhöht. Dagegen kann es aber bei der sogenannten Nephritis mit nephrotischem Einschlag oft zu größeren Eiweißausscheidungen kommen.

Bei einer anderen Gruppe von Krankheitsbildern, die nach *Volhard* als akute, nach *Fahr* als toxische Nephrose oder *(Wollheim, Moeller)* als tubuläre Insuffizienz („Lower nephronephrosis" der angloamerikanischen Literatur) zusammengefaßt werden, liegen infolge verschiedenartiger Ursachen vorwiegend tubulär lokalisierte Nierenveränderungen vor. Wegen der Störung der tubulären Rückresorption *(Moeller)* besteht eine Einschränkung der Konzentrationsfähigkeit. Es finden sich geringe Spuren von Harneiweiß. Im Sediment sind bisweilen 1 bis 10 Erythrozyten, geschwänzte oder verfettete Nierenepithelien und manchmal sogar Riesenzylinder vorhanden. Meist besteht eine Oligourie, gelegentlich in der Phase der Ausheilung auch eine Polyurie. Der Reststickstoff ist vorübergehend erhöht. Diese tubulären Insuffizienzen sind acht- bis zehnmal häufiger als die primär glomerulären Erkrankungen.

Wollheim gruppiert diese tubulären Nierenfunktionsstörungen in

I. Entzündlich-infektiöse Tubulärinsuffizienz
   a) Primär: Interstitielle Nephritis. Ursache der Funktionsstörung ist ein entzündlicher Prozeß im Interstitium um die Tubuli bei Hepatitis epidemica, Scharlach in den ersten Tagen, Typhus, Paratyphus und verschiedenen anderen Infekten.
   b) Aszendierend: Mehr eine mechanische Beeinträchtigung der Tubulusfunktion infolge Rückstauung bei Pyelonephritis, Steinniere oder Prostatahypertrophie.
   c) Deszendierend: Sogenannter nephrotischer Einschlag bei der chronischen Glomerulonephritis.

II. Allergisch-toxische Tubulärinsuffizienz
   Bei Quecksilber-, Sulfonamid- und Tetrachlorkohlenstoffvergiftung.

III. Vaskuläre Tubulärinsuffizienz
   a) Primär: Bei Zuständen mit Verkleinerung der aktiven Blutmenge und des Herzminutenvolumens, Gefäßinsuffizienzen verschiedenster Art, z. B. Schocksyndrom, Vasomotorenkollaps

(tiefe arterielle Blutdrucksenkung mit Gefährdung der glomerulären Filtration), Minusdekompensation (z. B. Myokardinfarkt), tubuläre Insuffizienz mit Reststickstofferhöhung nach großen intestinalen Blutungen, möglicherweise bei Stauungsniere, Plusdekompensation.

b) Deszendierend: Vaskuläre Schrumpfniere.

Nach *King* kommen haltungsbedingte Proteinurien („orthostatische Albuminurie") geringeren Grades intermittierend bei drei Vierteln aller Jugendlichen, einem Drittel aller jüngeren und einem Zehntel aller älteren Männer vor.

Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die nach *Hoff* der Glomerulonephritis nahe verwandten Befunde bei Nephropathia gravidarum, Präeklampsie und Eklampsie. *Burger* ordnet die Schwangerschaftsnierenerkrankungen zur Gruppe der Nephrosen. Bei der leichtesten Form besteht lediglich eine geringgradige Proteinurie von etwas mehr als einem Promille, die in etwa zehn Prozent der Schwangerschaften nachzuweisen ist *(Burger)*. Liegen die Proteinkonzentrationen noch unter einem Promille und ist das Harnsediment frei von Formelementen, so gilt dies noch nicht als pathologisch. Die Proteinkonzentration kann aber beträchtlich ansteigen und Werte von 20 und mehr Promille erreichen.

Es läßt sich jedoch nicht sicher entscheiden *(Prill* und *Knopp)*, ob bei den Schwangerschaftsnierenveränderungen wie bei der Nephrose eine primäre Nierenschädigung oder eine Veränderung der Serumeiweißköper mit sekundärer Nierenschädigung vorliegt.

Das Zusammentreffen eines chronischen Nierenleidens mit einer Schwangerschaft ist von großer Bedeutung. Oft ist die Unterscheidung eines chronischen Nierenleidens von einer Schwangerschaftstoxikose recht schwierig *(Burger)*. Die Proteinurie zählt in diesen Fällen zu den charakteristischen Symptomen. Treten die Krankheitszeichen, wie Blutdrucksteigerung, Proteinurie, Nierenfunktionsstörungen oder erhöhter Reststickstoffgehalt in der ersten Schwangerschaftshälfte auf, so handelt es sich im allgemeinen um ein chronisches Nierenleiden. Erhöhter Reststickstoffgehalt spricht mehr für ein chronisches Nierenleiden, während vermehrter Harnsäuregehalt, besonders bei abnehmender Harnausscheidung, mehr auf eine Schwangerschaftstoxikose hinweist. Auf jeden Fall aber spielt die Proteinurie dabei differentialdiagnostisch eine wichtige Rolle.

Ein chronisches Nierenleiden kann bei einer Erstgraviden etwas milder beurteilt werden als bei einer Mehrgebärenden *(Stander)*. Zwischen 60 bis 70 Prozent der Früchte der an chronischen Nierenerkrankungen leidenden Frauen gehen während der Gravidität zugrunde oder aber sie kommen zu früh zur Welt. Da Frauen mit chronischen Nierenleiden schwererer Art, die bereits mehrere Kinder geboren haben, wegen der drohenden, ernsten Gefahren möglichst eine weitere Schwangerschaft vermeiden sollen, kommt der Diagnose dieser Leiden große Bedeutung zu. Bei Toxikosen verfügen die Nieren über geringere Reserven („Lower reserve kidney"). Die Spät-

schwangerschaftstoxikosen werden eingeteilt *(Dubrauszky* und *Ott* u. a.) in leichte Fälle (Ödeme, Harnproteingehalt ein bis drei Promille, Blutdrucksteigerung auf 150 bis 180 mm Hg, keine subjektiven Symptome), schwere Fälle (Ödeme, Eiweißgehalt im Urin über drei Promille, Blutdrucksteigerung auf über 180 mm Hg, in der Regel ohne subjektive Symptome), Präeklampsie (mit subjektiven Symptomen, wie Augenflimmern, Magen- und Darmbeschwerden, Kopfschmerzen usw.) und Eklampsie (außer den üblichen toxischen Beschwerden typische Krampfanfälle). Mit der Schwere der mütterlichen Erkrankung steigt auch die absolute kindliche Mortalität an.

Schon Leyden erkannte die Beziehungen zwischen Proteinurie und Schwangerschaft. Von ihm stammt die Bezeichnung „Schwangerschaftsniere", als deren schwerste Komplikation er seinerzeit die Urämie und Eklampsie ansah.

Schwangerschaftsnephropathien treten bei Erstgraviden dreimal so häufig auf als bei Mehrgebärenden. Nierenfunktion und Konzentrationsfähigkeit sind jedoch meist nicht wesentlich verändert. Lediglich die Ausscheidung ist bei diesen Patientinnen etwas verzögert. Gelegentlich finden sich im Harnsediment sogar granulierte Zylinder, was dann auf eine gleichzeitig bestehende chronische Nephritis hinweisen kann. Der Eiweißgehalt des Urins ist dabei nicht selten hoch und erreicht gelegentlich sogar Werte zwischen 15 und 20 Promille. Schon die Sulfosalicylsäureprobe ergibt dann einen dicken Niederschlag.

Dieser Überblick umreißt die diagnostische Vielzahl der Symptome bei Nierenveränderungen verschiedener Genese. Er folgt daraus aber auch, wie wichtig eine sichere und schnelle Methode zur Feststellung des jeweiligen Grades der Proteinurie sein kann. So ist es auch verständlich, daß seit der Entdeckung der Eiweißausscheidung bei Nierenkrankheiten eine immer mehr zunehmende Fülle von verschiedenen, zum Teil auch recht originellen Nachweismethoden qualitativer und quantitativer Art bekanntgemacht wurde.

Die wohl populärste Harneiweißprobe, nämlich die Kochprobe, stammt nach *Korányi* von F. Dekkers aus dem Jahre 1694. Sie wird auch heute noch am häufigsten angewandt *(Ruppert)*, weil sie verhältnismäßig einfach und auch recht zuverlässig ist. Ihre Empfindlichkeit beginnt bei einem Proteingehalt von 0,05 bis 0,1 Promille. Durch die Verwendung von Essigsäureazetatpuffer, dessen pH auf 5,6 eingestellt ist, was dem isoelektrischen Punkt der Eiweißfällung entspricht, lassen sich Fehler weitgehend vermeiden.

Die von *G. Esbach* eingeführte bekannte Albuminimetermethode liefert ab einem Proteingehalt des Urins von 0,1 bis 0,3 Gramm je Liter nach Ansicht des Autors ablesbare Ergebnisse. *H. Schulz* und *A. Christensen* machten jedoch auf temperaturbedingte Fehlerquellen aufmerksam. *Esbach* selbst schlug vor, bei einem Proteingehalt von mehr als vier Gramm im Liter Harn die jeweiligen Proben zur Hälfte zu verdünnen. Auch durch zahlreiche Medikamente kann der Ausfall der Esbach-Probe verfälscht werden. Nach *Ammon* und *Zapp* ist die der Esbach-Methode zugrunde liegende Pikrinsäurefällung des Proteins n i c h t s p e z i f i s c h, weil auch Urate, Chinin-

und Urotropinbeimengungen Niederschläge ergeben und zum Teil sogar hohe Werte vortäuschen können. Aus diesen Gründen sprechen auch *Tilmanns-Ohnesorge* u. a. der Methode eine ausreichende Genauigkeit ab.

Das Schätzen der Proteinkonzentrationen von Harnproben aus der Höhe eines Niederschlages, der auf verschiedene Weise zu erzielen ist, erwies sich, wie besonders auch *J. Vogel* und *H. Veale* nachwiesen, als fragwürdig und fehlerreich.

Außer der bereits erwähnten Sulfosalicylsäureprobe, die *Ammon* und *Zapp* als die empfindlichste bezeichnen und die *(Ruppert)* ab einem Proteingehalt von 0,015 Promille positiv wird, jedoch nach *King* eine Fehlerbreite von ± zehn Prozent aufweist, wird auch die ab 0,033 Promille Proteingehalt positive Hellersche Ringprobe häufig verwendet. Salpetersaurer Harnstoff, harnsaure Salze und balsamische Stoffe können jedoch einen positiven Ausfall vortäuschen. So wurde zum Beispiel bei Neugeborenen eine Proteinurie festgestellt, die jedoch in etwa einem Drittel der Fälle durch massenhafte Uratbeimengungen vorgetäuscht worden war *(Doxiades, Goldfink* und *Cole).*

Bei der Durchsicht der Literatur überrascht die Vielzahl der diesbezüglichen Veröffentlichungen und eine recht unterschiedliche Beurteilung der Genauigkeit dieser einfacheren, in Klinik und Praxis täglich verwendeten Harnprotein-Nachweismethoden. Es entsteht dabei der Eindruck, als sei anscheinend keine Methode ohne Mangel oder geeignet, zufriedenstellende Resultate zu liefern.

Die früher viel gebrauchten refraktometrischen Methoden zur quantitativen Harnproteinbestimmung beurteilen *Hinsberg-Lang* u. a. günstig. Die Autoren weisen jedoch auf Unterschiede gegenüber sicheren Standardmethoden hin. Eine routinemäßige Anwendung wird nicht empfohlen, zumal auch *Starlinger* und *Hartl* feststellten, daß Gesamteiweiß und enteiweißtes Substrat nicht immer die zu fordernde jeweils konstante Refraktion aufweisen.

Recht beliebt war längere Zeit auch die von *R. A. Phillipps* und *D. van Slyke* beschriebene Kupfersulfatmethode, bei der die Proteinkonzentration mit Hilfe des ermittelten spezifischen Gewichtes bestimmt wurde.

Den kolorimetrischen Verfahren liegen nach *Albanese, Saur* und *Isby* Farbreaktionen bestimmter Aminosäuren oder die Biuretreaktion zugrunde. Sie sind ebenfalls weit verbreitet. Erwähnt seien hier zum Beispiel die Millonsche Reaktion, Schwefelprobe, Biuretreaktion *(Hiller, Greif, Beckmann, Autenrieth),* Xanthoproteinreaktion, Furfurol- oder Diazoreaktion. Zufriedenstellende Ergebnisse liefert die von *Hiller, McIntosh* und *van Slyke* angegebene kolorimetrische Proteinbestimmung.

Bei der Biuretreaktion bildet sich nach *Rose* und *Schiff* in Anwesenheit von -CO-NH-Gruppen in bestimmten Eiweißverbindungen Biuret-Kupferoxyd-Kali. *Macheboeuf, Lacaille und Rebeyrotte* stützen sich auf die Xanthoproteinreaktion.

Bei der Diazoreaktion, die ähnlich der Thyrosinfärbung auf der Bildung einer Diazoverbindung beruht, fanden *Haurowitz* und *Tekman* bei denatu-

riertem Eiweiß stärkere Farbtöne. Die Autoren empfehlen daher die auf der Biuretreaktion basierenden quantitativen Eiweißbestimmungsmethoden, weil sie nach ihrer Ansicht besser fundiert und durchgearbeitet sind.

Als Methode der Wahl bezeichnen hinsichtlich der Genauigkeit bei sachgemäßer Ausführung *Tilmanns-Ohnesorge* und andere Verfasser die quantitative Eiweißbestimmung nach Kjeldahl. *Abelin* und *Pfister* bezeichnen diese Methode als sehr zeitraubend. Die einzelnen Arbeitsgänge, wie zum Beispiel Veraschung, Destillation, Titration oder Nesslerisation können nach Ansicht dieser Autoren Fehlerquellen darstellen. *Hiller, Plazin* und *van Slyke* empfehlen als Katalysator zur Veraschung den Zusatz von Quecksilber(II)-sulfat, weil mit Selenoxyd bei längerem Erhitzen bis zu zwei Prozent Stickstoff verlorengehen.

Bekannt sind gewichtsanalytische Harneiweißbestimmungen *(Folin* und *Denis).* Über eine nephelometrische Proteinbestimmungsmethode berichtete in neuerer Zeit *G. Schneider.* Es handelt sich dabei um Konzentrationsbestimmungen durch photometrische Messung einer infolge einer Trübung auftretenden Lichtabsorption, wobei die Lichtschwächung der Konzentration proportional ist.

Nach *K. Hinsberg* kann das Eiweiß im schwach sauren Milieu durch Hitzeeinwirkung ausgefällt werden. Anschließend läßt sich der ausgewaschene und getrocknete Niederschlag wiegen. Eine weitere Möglichkeit ist die Bestimmung des Proteinstickstoffes. Außerdem lassen sich die Eiweißkörper auch aussalzen. Sinngemäß eignen sich nach Meinung von *Hinsberg* die zur Bestimmung des Serumproteingehaltes angegebenen Methoden auch zur quantitativen Harnproteinbestimmung.

In letzter Zeit versuchten *Gunton* und *Burton,* den Proteingehalt des Urins mit Hilfe der Bestimmung der Oberflächenspannung zu ermitteln.

Beltombe und *Bandimont* beobachteten, daß Nitroprussidnatrium im sauren Milieu ein sehr empfindliches Eiweißreagens ist, das schon bei einem Proteingehalt von 0,005 Prozent eine schwache Trübung erzeugt.

Es wurden verschiedene Vorschläge gemacht, einfache und rasch ausführbare Methoden zur Harnproteinbestimmung zu finden und dabei möglichst die fehlerreiche Veraschung zu vermeiden. In diesem Zusammenhang sei hier noch einmal an die Biuretmethode sowie an die Beziehungen zwischen spezifischem Gewicht und Eiweißgehalt erinnert. *Van Slyke, Hiller, Phillipps, Hamilton, Dole, Archibald* und *Eder* haben auf die bei der Bestimmung des spezifischen Gewichtes mit der Kupfersulfatmethode zu beachtenden Punkte hingewiesen.

Angesichts der zahlreichen Mitteilungen über quantitative Proteinbestimmungen im Harn und ihre zum Teil recht unterschiedliche Beurteilung rät *Hoppe-Seyler,* immer gleichzeitig mehrere Methoden anzuwenden. Nach den Angaben dieses Autors staffelt sich die Empfindlichkeit der verschiedenen quantitativen Proteinbestimmungsmethoden für Harn wie folgt:

Methode	Niedrigste erfaßbare Proteinmenge in Milligramm
Ninhydrin	0,02
Mikro-Kjeldahl (kolorimetrisch)	0,06
Biuretreaktion	0,08
Spektrophotometermethode (Beckmann)	0,09
Phenolreagens	0,10
Mikro-Kjeldahl (titrimetrisch)	0,12

Von den vielen Methoden hat sich besonders die Esbachsche Albuminimeterbestimmung für die routinemäßige Anwendung in Klinik und Praxis behauptet. Trotz der zum Teil beträchtlichen Fehlermöglichkeiten und der Tatsache, daß im Esbach-Albuminimeter die abgesetzte Eiweißmenge erst nach 24 Stunden abgelesen werden kann, ist die Methode, die keine technischen Schwierigkeiten bereitet, weit verbreitet.

Die vorliegende Arbeit hat den Zweck, eine möglichst genaue und leicht ausführbare Methode zur quantitativen Bestimmung pathologischer Harnproteinkonzentrationen zu prüfen, die sofort ablesbare Ergebnisse liefert.

III. METHODIK

Dieser Arbeit liegt eine quantitative Harnproteinbestimmungsmethode zugrunde, die mit quaternären Ammoniumverbindungen ausgeführt wurde. Das in den Harnproben enthaltene Protein wurde mit diesen quaternären Ammoniumverbindungen, die auch unter der Bezeichnung „Invertseifen" bekannt sind, in Form einer Titration mit Trübungsreaktion ausgefällt.

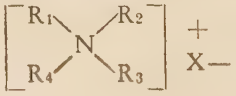
Über eine solche Titrationsmethode zur quantitativen Harnproteinbestimmung berichtete *Chinard*.

„Invertseifen" werden heute vorwiegend zur Desinfektion benutzt *(Lawrence, Steingold, Wood, Finch)*. Es handelt sich dabei um Ammoniumverbindungen, in denen die vier Wasserstoffatome des NH_4 durch Alkyle, wie zum Beispiel Methyl (CH_3) oder Äthyl (C_2H_5) ersetzt sind.

Vor der genauen Beschreibung der Methodik sollen hier zum besseren Verständnis einige Hinweise über den Charakter dieser quaternären Ammoniumverbindungen vorausgeschickt werden.

Die bakterizide Wirkung der „Invertseifen" ist schon seit längerer Zeit bekannt. Bereits 1916 veröffentlichten *Jakobs* und *Mitarbeiter* nähere Einzelheiten darüber.

Wie *Stangegärd* mitteilt, veranlaßten aber erst die Forschungsergebnisse von *Domagk*, daß die antiseptische Wirkung dieser quaternären Ammoniumverbindungen weiter untersucht wurde. *Domagk* fand schon 1935 eine Reihe von Verbindungen, denen folgende Struktur zugrunde liegt:



Ein Radikal entspricht einer mehrgliedrigen aliphatischen Kohlenwasserstoffkette, die von C_8H_{17} bis zu $C_{18}H_{37}$ reichen kann. Die anderen Radikale sind Benzyle oder weniger umfangreiche Alkyle. Die Bezeichnung X— steht meist an Stelle eines Halogens.

Später wurden Verbindungen hergestellt, bei denen zum Beispiel drei Radikale mit dem Stickstoffatom zusammen einen heterozyklischen Ring bilden, wie etwa im Cetylpyridinchlorid:

Quaternäre Ammoniumverbindungen („Invertseifen"), wie sie hier interessieren, sind seifenähnliche Stoffe. Sie ionisieren im Wasser wie gewöhnliche Seifen. Das quaternäre Ammonium besteht aus einer wasserlöslichen Gruppe und aus dem fettlöslichen Alkyl. Werden solche Ionen in eine aus Wasser und Fett bestehende Mischung gebracht, so wird das Fett durch die langen Alkylgruppen emulgiert. Der hydrophile Rest bleibt wasserlöslich. Auf diese Weise entsteht eine Fettemulsion, die mit Wasser leicht abzuspülen ist.

Die aktiven Anteile gewöhnlicher Seifen sind Anionen. Bei den „Invertseifen" sind es dagegen die positiv aufgeladenen Kationen. Anionen und Kationen können sich gegenseitig „neutralisieren". Deshalb sollen „Invertseifen" niemals zusammen mit gewöhnlichen Seifen oder mit anderen anionischen Fällungsmitteln verwendet werden *(Stangegärd)*.

Weniger bekannt sind die Ursachen der bakteriziden Wirkung der „Invertseifen". Vermutlich werden jedoch deren Ionen von der Oberfläche der Bakterien adsorbiert und denaturieren ihre Eiweißstrukturen, so daß sie absterben. Die Oberflächenaktivität kann jedoch nicht allein für diesen Wirkungsmechanismus verantwortlich gemacht werden, zumal es andere oberflächenaktive Substanzen gibt, die keine solche Wirksamkeit besitzen. Auf dieser speziellen Eiweißdenaturierung basiert die Verwendung der „Invertseifen" als Eiweißfäller.

Chinard führt die Eiweißfällung durch kationische Fällungsmittel („Invertseifen") auf die Bildung eines unlöslichen Anion-Kation-Komplexes zwischen quaternären Ammoniumionen und Proteinen im alkalischen Milieu zurück. Der Niederschlag tritt jedoch erst dann auf, wenn ein leichter Überschuß des Fällungsmittels vorhanden ist. Die Fällung beginnt mit einer eben sichtbaren aber beständigen Trübung. Die Methode ist nach *Polonovski, Macheboeuf, Schmidt* und *Valko* für die meisten Fälle von Proteinurie verwendbar.

Als Arbeitshypothese gibt *Chinard* in Anlehnung an *Polonovski* und *Macheboeuf* an, daß bei einem pH von 13 alle Carboxyl-, Phenol- und Sulfhydrilgruppen dissoziiert sind. Vorhanden bleiben lediglich einige elektropositive Guanidingruppen. Die meisten Proteinmoleküle haben nun eine elektronegative Ladung. Sobald „Invertseife" zur Proteinlösung kommt,

ziehen die elektronegativen Ladungen der Proteinmoleküle infolge Coulombscher Kräftewirkung die elektropositiven quaternären Ammoniumionen an.

Je mehr elektronegative Ladungen der Proteinmoleküle von den elektropositiven quaternären Ammoniumionen „neutralisiert" werden, desto mehr verlieren die Proteinmoleküle ihre Polarität, bis schließlich ein „Endpunkt" erreicht ist. Wird jetzt noch mehr Fällungsmittel zugegeben, so werden die nicht polarisierten Anteile dieses weiterhin hinzugefügten Fällungsmittels durch die Van-der-Waals-Kräfte mit den nicht polarisierten Anteilen der an Proteinmoleküle gebundenen quaternären Ammoniumionen vereinigt. Dadurch erfahren aber nun die Komplexe Protein—Fällungsmittel eine positive Aufladung, so daß sie sich gegenseitig abstoßen. Der zunächst erzielte Trübungsgrad hellt sich daher wieder etwas auf.

Die Stickstoffsubstituenten unter den Fällungsmitteln spielen bei der Wirkung der Van-der-Waals-Kräfte eine Rolle. Möglicherweise sind sie auch dafür verantwortlich, daß mit Alkyltrimethyl, Alkylmethyläthyl, Alkylimidazol und quaternären Alkylpyridinverbindungen keine zufriedenstellenden Trübungen zu erzielen sind. Für eine bestimmte Proteinkonzentration ist jeweils eine ganz bestimmte Menge Fällungsmittel erforderlich, um eine bestehenbleibende Trübung zu erreichen. Daher kann dann aus der Menge des verbrauchten Fällungsmittels auf die jeweils vorhandene Proteinkonzentration geschlossen werden.

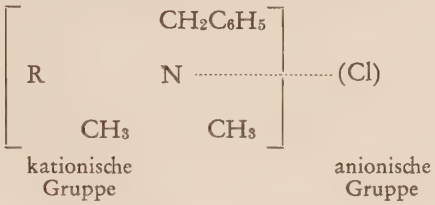
Eine im Prinzip ähnliche, wenn auch etwas kompliziertere und zeitraubendere Bestimmungsmethode wurde von *Lambert* zur volumetrischen Analyse von anionischen und kationischen Fällungsmitteln mit Trübungsreaktion mitgeteilt. Die Trübung wird dabei photometrisch bestimmt. Die Methode eignet sich nach Meinung des Verfassers unter Beachtung besonderer Bedingungen auch für die Eiweißbestimmung.

Abelin und *Pfister* berichten über eine quantitative Eiweißbestimmung mit „Invertseife" (Myristamidopropyldimethylbenzylammoniumchlorid), allerdings im Blutserum.

Nach den von *Putnam, Neurath, Pankhurst, Smith, Pfannkuch* und *Kausche* sowie von *Polonovski* und *Macheboeuf* gesammelten Erfahrungen ist die eiweißfällende Wirkung dieser polarhydrophilhydrophoben Verbindungen im wesentlichen auf eine gegenseitige Ausfällung zweier entgegengesetzt elektrisch geladener Kolloide zurückzuführen. Dabei wird das Protein durch Zugabe starker Lauge in die anionische Form übergeführt. Die stickstoffhaltige „Invertseife" ist elektropositiv geladen. Aus der Menge der zur Fällung verbrauchten „Invertseife" läßt sich die Proteinkonzentration bestimmen.

Chinard titrierte mit Myristamidopropyldimethylbenzylammoniumchlorid. Bei der vorliegenden Arbeit benutzte ich das Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid und eine Mischung von 0,25 Millilitern Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid mit 0,25 Millilitern BTC 50 Prozent in 500 Millilitern destilliertem Wasser.

Das BTC 50 Prozent ist ein kationisches, oberflächenaktives quaternäres Ammoniumsalz, dessen Strukturformel wie folgt aufgebaut ist:



In dieser Struktur bedeutet R ein höheres Alkylradikal zwischen C_8H_{17} und $C_{18}H_{37}$, meist jedoch $C_{12}H_{25}$ oder $C_{14}H_{29}$.

Zur Titration wurden jeweils 0,2 Milliliter Urin in einem kleinen Becherglas mit 4,0 Millilitern destilliertem Wasser verdünnt und 0,2 Milliliter 2n Natronlauge hinzugefügt, um das für die Trübungsreaktion optimale *(Chinard)* pH von annähernd 13 herzustellen.

Das Fällungsmittel wurde dann unter ständigem Schwenken des Becherglases aus einer Zwei-Milliliter-Burette langsam zugetropft. Das Umschwenken ist deshalb erforderlich, weil jeder Tropfen „Invertseife" in der Harnverdünnung eine kleine, wölkchenartige Trübungszone erzeugt, die sich aber vor Eintritt der bestehenbleibenden Trübung beim Umschwenken immer wieder auflöst. Die „Invertseife" wird deshalb langsam zugetropft, damit an der Oberfläche der Harnverdünnung kein seifiger Schaum entsteht, der das rechtzeitige Erkennen der erwünschten Trübung verhindern kann.

Die „Invertseife" wurde solange zugetropft, bis eine b e s t e h e n b l e i b e n d e e r s t e A n f a n g s t r ü b u n g sichtbar wurde. Diese Anfangstrübung ist sowohl bei durchfallendem Tageslicht als auch bei Kunstlicht leicht zu erkennen. Die Titration dauert nur wenige Minuten.

Entsprechend den Angaben von *Hiller, McIntosh* und *van Slyke* wurde eine Biuretstandardkurve angefertigt. Dazu wurde die Lichtabsorption von Proben reiner Biuretlösung mit jeweils bekannter Konzentration im Universal-Kolorimeter nach *Lange* gemessen. Es liefert dabei die Konzentration von einem Milligramm reinem Biuret dieselbe Farbintensität und Lichtabsorption wie 0,924 Milligramm Protein. Dieses „Biuretäquivalent" ist durch Vergleichsmessungen nach der Kjeldahl-Methode gesichert worden.

Wenn Urin mit einem pH von etwa 7,4 mit Trichloressigsäure versetzt und anschließend zentrifugiert wird, so läßt sich mit dem in Natronlauge gelösten Sediment unter Zugabe von Kupfersulfat die Biuretreaktion erzeugen. Je nach Größe der Proteinkonzentration entsteht ein mehr oder weniger intensiver blauvioletter Farbton. Die Lichtabsorption läßt sich im Lange-Universalkolorimeter messen. Aus der mit reiner Biuretlösung erstellten Eichkurve lassen sich nun die entsprechenden Proteinkonzentrationen ablesen.

Gleichlaufend mit jeder Urintitration mit „Invertseife" wurde die Proteinkonzentration mit der oben beschriebenen Biuretmethode bestimmt. Dazu

wurden die Urinproben jeweils auf ein pH von etwa 7,4 *(Chinard)* eingestellt. Jeweils 0,2 Milliliter Urin versetzte ich in einem graduierten Zentrifugenglas (Inhalt zehn Milliliter) mit zwei Kubikzentimeter zehnprozentiger Trichloressigsäure, um das Protein auszufällen. Anschließend wurde fünf Minuten bei mittlerer Geschwindigkeit zentrifugiert und die überstehende klare Flüssigkeit vorsichtig abgeschüttet. Das Sediment wurde zunächst in drei Kubikzentimeter dreiprozentiger Natronlauge gelöst. Nach der Lösung wurden weitere sechs Kubikzentimeter dreiprozentige Natronlauge hinzugefügt. Mit 0,25 Kubikzentimeter 20prozentiger Kupfersulfatlösung und dreiprozentiger Natronlauge wurde jetzt das Zentrifugenglas vollends auf zehn Kubikzentimeter aufgefüllt, nach Verschluß mit einem Gummistopfen kräftig geschüttelt und zehn Minuten später, nach Eintritt der typischen Biuretfärbung, nochmals fünf Minuten lang zentrifugiert. Die überstehende farbige Flüssigkeit wurde in die Kolorimetercouvette geschüttet. Die entsprechende Lichtabsorption wurde im Lange-Universal-Kolorimeter gemessen. Als Vergleichslösung *(Lange)* dienten zehn Kubikzentimeter dreiprozentige Natronlauge.

Außer der Bestimmung der Harnproteinkonzentration mit der beschriebenen Titration mit „Invertseife" und der Biuretmethode wurden von jeder Urinprobe zwei Esbach-Bestimmungen ausgeführt. Dazu wurden beide Albuminimeterröhrchen nach Vorschrift bis zur Marke U mit Urin und bis zur Marke R mit dem Esbach-Reagens aufgefüllt, hernach mit einem Gummistopfen verschlossen, durchgemischt und das eine Albuminimeter, wie üblich, 24 Stunden lang stehengelassen und dann abgelesen. Nach einer Angabe von *Lenk* wurde in das zweite Albuminimeterröhrchen eine Messerspitze voll Bimssteinmehl gegeben. Es bildete sich daraufhin in den meisten Fällen ein Niederschlag, der bereits nach zehn Minuten abgelesen werden konnte.

IV. EIGENE UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

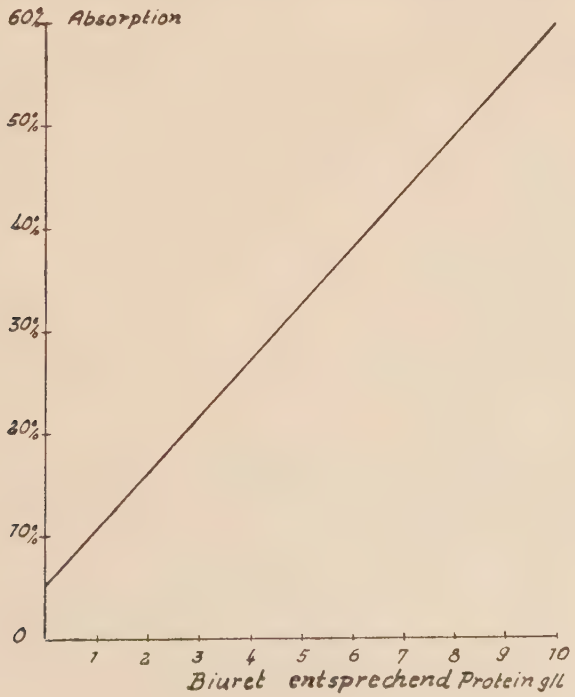
Im folgenden soll nun über die Untersuchungen der Urinproben auf ihren Proteingehalt berichtet werden. Von jeder Probe wurde der Eiweißgehalt titrimetrisch mit „Invertseife" bestimmt. Außerdem wurde die Eiweißkonzentration, jeweils kolorimetrisch (Biuretmethode) und mit der Esbach-Methode ermittelt.

Eine Biuretstandardkurve ließ sich nach den Angaben von *Hiller, McIntosh* und *van Slyke* anfertigen. Diese Autoren fanden, daß ein Milligramm reines Biuret dieselbe Lichtabsorption erzeugt wie 0,924 Milligramm irgendeines Proteins. Das Lange-Universal-Kolarimeter wurde auf einen Meßbereich von 0 bis 60 Prozent eingestellt. Die Eichkurve zur kolorimetrischen Bestimmung der Biuret-Eiweißäquivalente wurde mit einer Biuretstandardlösung hergestellt, wobei 200 Milligramm reines Biuret in 100 Kubikzentimeter destilliertem Wasser gelöst waren. Dabei wurden folgende Meßergebnisse ermittelt:

Biuretlösung ccm	Biuretgehalt mg	Eiweißäquivalent mg bzw. Gramm/Liter	Prozent Lichtabsorption
0,125	0,25	0,231	3
0,250	0,50	0,462	5
0,500	1,00	0,924	9
1,000	2,00	1,848	15
1,500	3,00	2,772	24
2,000	4,00	3,696	27
2,500	5,00	4,620	33
3,000	6,00	5,544	37
3,500	7,00	6,468	40
4,000	8,00	7,392	45
5,000	10,00	9,240	54
6,000	12,00	11,088	60

Tabelle: Biureteichwerte der im Lange-Universal-Kolorimeter mit reiner Biuretlösung gemessenen Lichtabsorption.

Die mit diesen Werten aufgezeichnete Biureteichkurve zeigt folgenden Verlauf:



Die Titration mit „Invertseife“ wurde mit jeder Urinprobe zweimal ausgeführt.

Nach dem in der Universitäts-Frauenklinik Würzburg zur Verfügung stehenden Krankengut handelte es sich zum großen Teil um Harnproben von Patientinnen mit Schwangerschaftsnephropathien und in einigen Fällen um solche mit Präeklampsien und Eklampsien. Außerdem wurden Urinproben von Patienten aus anderen Würzburger Universitätskliniken untersucht.

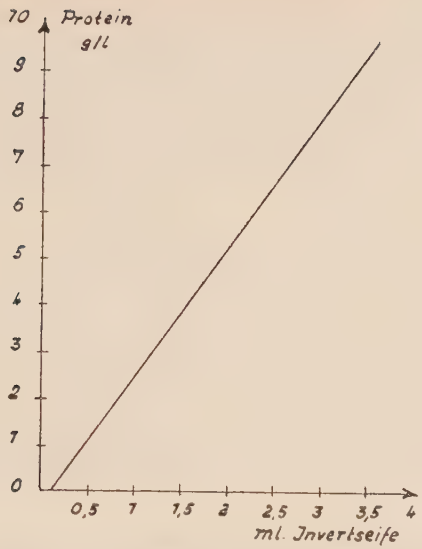
Aus dem vom Herbst 1954 bis zum Frühjahr 1956 anfallenden Untersuchungsmaterial wurden 845 Harnproben verwendet. Es handelte sich dabei im einzelnen um Harnproben von:

Klinische Diagnose	Anzahl der Proben
Nephropathie	482
Präeklampsie	15
Eklampsie	5
Nephritis	28
Nephritis mit nephrotischem Einschlag	64
Subchronische Nephritis	16
„Nephrosen“	28
Kindliche Nephrosen	4
Pyelonephritis	3
Nierentuberkulose	1
Nierenquetschung	2
Cystitis	4
Prostatahypertrophie	100
Maligne Blasenpapillomatose	7
Blasenplastik	10
Harnröhrenplastik	3
Myelom	28
Rektumkarzinom	41
Metastasierendes Darmkarzinom	4
Summe	845

Tabelle: Aufgliederung der 845 verwendeten Harnproben nach der klinischen Diagnose.

Zuerst wurde mit der „Invertseife“ Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid titriert. Diese quaternäre Ammoniumverbindung wurde dazu in einer Verdünnung von 0,50 Milliliter in 500 Milliliter destilliertem Wasser verwendet. Als Trübungsendpunkt galt die in jedem Fall beobachtete Anfangstrübung. Es handelte sich dabei um das erste sichtbare Zeichen einer bleibenden, bläulichgrauen Trübung.

Die 470, mit Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid titrierten Harnproben ergeben, wenn die Anfangstrübungen der jeweiligen Proteinkonzentration in ein Koordinatensystem eingezeichnet werden, folgende Kurve:



Kurve der bei 470 mit Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid titrierten Harnproben erzielten Anfangstrübungen.

Die Titration lieferte bei Verwendung der Anfangstrübung recht brauchbare Ergebnisse. Die Zusammenstellung der Mittelwerte ergibt folgendes Bild:

Eiweißgehalt Gramm je Liter	Mittelwerte der Anfangstrübung (Milliliter)	Standardabweichung ±
0,5	0,30	0,145
1,0	0,50	0,500
2,0	0,76	0,246
3,0	1,20	0,288
4,0	1,60	0,098
5,0	2,00	0,104
6,0	2,31	0,063
7,0	2,70	0,161
8,0	3,00	0,264
9,0	3,52	0,180
10,0	3,50	1,389

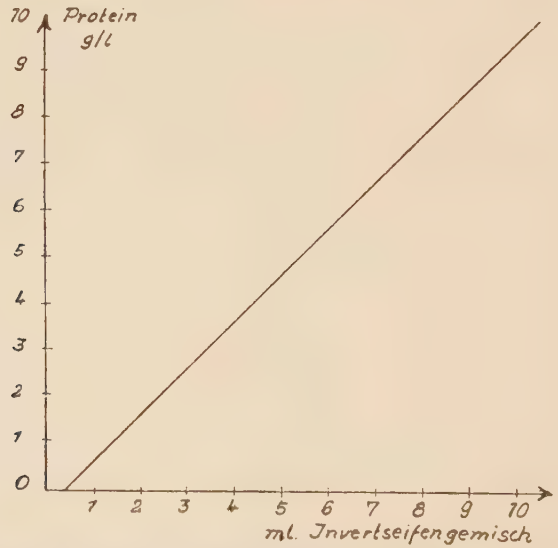
Tabelle: Mittelwerte (Milliliter verwendete „Invertseife") und Standardabweichungen der Harntitrationen mit Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid.

Die Verteilung der Titrationsergebnisse auf der Kurve läßt erkennen, daß die Menge der zu den verschiedenen Anfangstrübungen benötigten „Invert-

seife“ von 0,30 Milliliter bei 0,50 Gramm Protein im Liter Urin bis 3,50 Milliliter bei 10,0 Gramm Protein je Liter Urin reicht. Die Werte liegen so eng beisammen, daß selbst geringfügige Abweichungen schon beträchtliche Fehler bedeuten können. Deshalb ist das Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid zur routinemäßigen quantitativen Harnproteinbestimmung kaum geeignet. Auch mit größeren Verdünnungen ließen sich keine besseren Titrationsergebnisse erzielen.

Nach längeren Experimenten mit verschiedenen Verdünnungen und Mischungen von „Invertseifen“ erwies sich dann eine Kombination von Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid mit BTC 50 Prozent als günstig.

Mit diesem Gemisch wurden ebenfalls Harnproben titriert, die vorher kolorimetrisch bestimmt waren und von denen auch die beiden bereits erwähnten Esbach-Bestimmungen angestellt wurden. Es handelte sich um 375 Urinproben. Verwendet wurde wieder die erste bleibende Anfangstrübung, die auch hierbei in jedem Fall beobachtet wurde. Die in ein Koordinatensystem eingetragenen Titrationsergebnisse ergeben folgende Kurve:



Kurve der bei 375 Urinproben mit „Invertseifengemisch“ erzielten Anfangstrübungen.

Mit dem „Invertseifengemisch“ trat die Anfangstrübung deutlicher und rascher ein. Die einzelnen Proteinkonzentrationen lieferten außerdem Titrationsergebnisse, welche weit genug auseinanderliegen, so daß auch kleinere Schwankungen kaum Bedeutung haben. Die Zusammenstellung der Mittelwerte ergibt folgendes Bild:

Eiweißgehalt Gramm je Liter	Mittelwerte der Anfangstrübung (Milliliter)	Standardabweichung ±
0,5	0,97	0,306
1,0	1,52	0,078
2,0	2,51	0,094
3,0	3,49	0,116
4,0	4,60	0,104
5,0	5,59	0,014
6,0	6,63	0,031
7,0	7,64	0,126
8,0	8,74	0,169
9,0	9,75	0,038
10,0	10,61	0,412

Tabelle: Mittelwerte und Standardabweichungen der Harntitrationen mit „Invertseifengemisch".

Das verwendete „Invertseifengemisch" bestand aus 0,25 Millilitern Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid und 0,25 Millilitern BTC 50 Prozent, gelöst in 500 Milliliter destilliertem Wasser.

Mit den 845 Harnproben wurden, wie erwähnt, auch Esbach-Bestimmungen ausgeführt. Ein Albuminimeter wurde jeweils nach 24 Stunden abgelesen. Das zweite Albuminimeter konnte nach vorheriger Zugabe von Bimssteinmehl bereits nach zehn Minuten abgelesen werden. Eine Gegenüberstellung der dabei erzielten Ergebnisse zeigt folgendes Bild:

Eiweißkonzentration in Gramm je Liter Urin, kolorimetrisch (Biuretmethode) bestimmt	Esbachwert 10 Minuten nach Bimssteinmehlzugabe, Gramm je Liter Urin (Mittelwerte)	Esbachwert nach 24 Stunden abgelesen, Gramm je Liter Urin (Mittelwerte)
0,5	0,42	0,50
1,0	0,71	1,41
2,0	2,42	2,10
3,0	2,83	3,07
4,0	4,02	4,40
5,0	4,73	4,40
6,0	5,31	3,17
7,0	6,65	6,99
8,0	6,35	8,22
9,0	5,89	6,48
10,0	5,51	6,53

Tabelle: Gegenüberstellung der bei 845 kolorimetrisch und nach der Esbach-Methode ermittelten Harnproteinbestimmungen erzielten Ergebnisse.

Diese Gegenüberstellung zeigt, daß mit der Esbach-Methode keine genauen Werte erzielt werden konnten. Besonders auffallend sind die Abweichungen bei höheren Proteinkonzentrationen. Eine ganze Anzahl von Harnproben konnte mit der von Esbach angegebenen Albuminimetermethode überhaupt nicht bestimmt werden, weil der zunächst vorhandene Niederschlag sich später entweder wieder auflöste und die ganze, im Albuminimeter stehende Flüssigkeitssäule trübte, oder einfach hochstieg und unter der Flüssigkeitsoberfläche „hängen" blieb.

Die beschriebene kolorimetrische Harnproteinbestimmung, wie sie bei dieser Arbeit angewandt wurde, läßt sich verhältnismäßig rasch ausführen.

V. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Vielzahl der in den letzten rund 150 Jahren veröffentlichten Methoden zur quantitativen Urineiweißbestimmung unterstreicht deutlich eine gewisse Unsicherheit, welche diesen Methoden mehr oder weniger anhaftet.

Auch zunächst für recht zuverlässig gehaltene Verfahren, wie zum Beispiel die Methode von *W. Roberts* und *J. Stolnikoff*, die *Brandenberg* und *Hammarsten* modifizierten, das heißt die jeweilige Harnprobe solange mit Wasser verdünnten, bis die *Hellersche* Salpetersäure-Ringprobe nach zwei bis drei Minuten auftrat, wobei dann dreieindrittel Milligramm Eiweiß je Kubikzentimeter vorhanden sein sollen, weisen zum Teil beträchtliche Abweichungen und Fehler auf *(Hammarsten, K. A. Mörner* u. a.).

Die Zahl der zur Eiweißfällung benutzten Stoffe und Reagentien wurde immer größer *(Berg, Leneberger, Rosenmund, Hallmann, Hinsberg, Marx, Peters, Abelin, Franke)*. Der Wunsch nach möglichst rasch ausführbaren und zuverlässigen quantitativen Bestimmungsmethoden stand bei allen Versuchen auf diesem Gebiet deutlich im Vordergrund.

Neuere Untersuchungen *(Sandkühler* u. a.) zeigten, daß eine „echte" Albuminurie relativ selten vorkommt. Bei proteinhaltigen Harnproben liegen fast immer mehrere Eiweißfraktionen vor. Die Proteinurie ist ein feines diagnostisches Reagens für Nierenstörungen, jedoch nur im Zusammenhang mit den entsprechenden klinischen Symptomen. Die ausgeschiedene Eiweißmenge schwankt zwischen Spuren bis zu 60 Promille. Der Gesamteiweißverlust beträgt aber innerhalb von 24 Stunden selten mehr als zehn Gramm. Die quantitative Harneiweißbestimmung hat daher nur beschränkten Wert.

Die vorliegende Arbeit hat den Zweck, eine quantitative Methode zur Bestimmung der Harnproteinkonzentration zu prüfen, die in Klinik und Praxis schnell ausführbar und zuverlässig ist. Ein rasches Orientieren über den Grad einer vorhandenen Proteinurie ist besonders auch für die Schwangerenberatung und für die Geburtshilfe wichtig.

Die Versuche zeigten, daß mit einem „Inverteifengemisch" (0,25 Milliliter Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid und 0,25 Milliliter BTC 50 Prozent gelöst in 500 Millilitern destilliertem Wasser) Harnprotein ausgefällt werden

kann, wenn der Urinprobe (0,2 Milliliter Urin verdünnt mit vier Milliliter destilliertem Wasser) vorher Natronlauge (0,2 Milliliter 2n Natronlauge) zugefügt wird, um das für die Trübungsreaktion optimale pH von annähernd 13 *(Chinard)* herzustellen. Das „Invertseifengemisch" wird am besten unter ständigem Schwenken der in einem Becherglas befindlichen Harnprobe aus einer Zwei-Milliliter-Burette langsam zugetropft. Das Umschwenken ist deshalb erforderlich, weil jeder Tropfen des „Invertseifengemisches" in der Harnverdünnung eine kleine, wölkchenartige Trübungszone erzeugt, die aber vor dem Eintritt der bestehen bleibenden Trübung beim Umschwenken wieder verschwindet. Das „Invertseifengemisch" wird zudem sehr langsam zugetropft, damit an der Oberfläche der Harnverdünnung kein seifiger Schaum entstehen kann, der das rechtzeitige Erkennen der erwünschten Anfangstrübung verhindern kann.

Bei der Titration entsteht eine in jedem Fall zu beobachtende „Anfangstrübung". Zum quantitativen Nachweis von Harnproteinkonzentrationen zwischen 0,5 bis 10,0 Gramm je Liter waren 0,97 bis 10,61 Milliliter (Mittelwerte) „Invertseifengemisch" erforderlich. Aus der Menge des jeweils verbrauchten Fällungsmittels läßt sich die Größe der Proteinkonzentration bestimmen. Die Titration ist schnell ausführbar und liefert brauchbare Ergebnisse, die durch den Vergleich mit kolorimetrischen Parallelbestimmungen (Biuretmethode) gesichert wurden.

Die Titration mit „Invertseifengemisch" gestattet es, täglich mehrmals die Proteinmenge im Harn des einzelnen Patienten zu bestimmen. Dies erlaubt dann eine bessere Beurteilung, weil innerhalb von 24 Stunden große Schwankungen in der Proteinausscheidung vorkommen können, die mit einer einmaligen Bestimmung dann nicht ausreichend genug erfaßt werden können. Die Methode ist außerdem unkompliziert und kann in jedem Sprechzimmer ausgeführt werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Nach einer Übersicht über die Literatur der Harnproteinbestimmungen und der Diskussion über den Mechanismus der Eiweißfällung durch quaternäre Ammoniumverbindungen („Invertseifen"), wurde untersucht, ob mit „Invertseife" eine rasche und zuverlässige titrimetrische Bestimmung der Harnproteinkonzentrationen möglich ist. Von 845 Harnproben wurden 470 mit Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid (0,50 Milliliter gelöst in 500 Milliliter destilliertem Wasser) titriert. Aufgezeichnet wurde das Auftreten einer bleibenden Anfangstrübung. Die Urinproben wurden vorher mit destilliertem Wasser verdünnt und mit Natronlauge auf ein für die Trübungsreaktion optimales pH von annähernd 13 eingestellt.

Die Titrationskurve verläuft bei Proteinkonzentrationen von 0,5 bis 10,0 Gramm je Liter Urin sehr steil zwischen 0,30 bis 3,50 Milliliter „Invertseife". Schon geringe Abweichungen können zu falschen Ergebnissen führen.

Deshalb erscheint das Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid zur Harnproteinbestimmung weniger geeignet.

Mit einem „Invertseifengemisch" von 0,25 Millilitern Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid und 0,25 Millilitern BTC 50 Prozent in 500 Millilitern destilliertem Wasser wurden 375 Harnproben titriert. Die damit ermittelte Titrationskurve der einzelnen Proteinkonzentrationen verläuft wesentlich flacher. Die Werte liegen für Eiweißkonzentrationen von 0,5 bis 10,0 Gramm je Liter Urin zwischen 0,97 bis 10,61 Millilitern des „Invertseifengemisches". Diese Titrationswerte liegen genügend weit auseinander, so daß kleinere Abweichungen nicht so sehr ins Gewicht fallen.

Von jeder titrierten Harnprobe wurde zuerst der Proteingehalt kolorimetrisch (Biuretmethode) bestimmt. Ein Vergleich der Ergebnisse beider Bestimmungen mit der ebenfalls in jedem Fall ausgeführten Eiweißmessung nach Esbach (Albuminimeterbestimmung) zeigt, daß damit weniger zuverlässige Ergebnisse zu erzielen waren. Besonders bei höheren Proteinkonzentrationen wichen die Ergebnisse stark ab. Die besten Resultate finden sich mit der Esbach-Methode bei vier Gramm Eiweiß je Liter Urin.

Die Titration mit „Invertseifengemisch" ermöglicht es innerhalb weniger Minuten, die Harnproteinkonzentrationen zu bestimmen. Es können deshalb mehrmals täglich vom gleichen Patienten Urinproben untersucht und die Schwankungen in der Eiweißausscheidung besser erfaßt werden. Die Schnellmethode kann auch für die Schwangerenberatung und die Geburtshilfe eine Unterstützung bedeuten, weil die Diagnose von Schwangerschaftsnephropathien, präeklamptischen Zuständen oder sonstigen pathologischen Veränderungen, die mit einer Proteinurie einhergehen, dadurch ergänzt wird. Zudem hat die Methode den Vorteil, daß sie rasch und leicht auszuführen ist.

Am Schluß der vorliegenden Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. med. K. Burger für die Überlassung des Themas herzlich danken, ebenso Herrn Privatdozenten Dr. med. L. Neuhaus für seine wertvollen Anregungen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abelin, J.: Spezielle klinisch-chemische Methoden, Stuttgart (1952)

Abelin, J., und Pfister, H.: Über die quantitative Bestimmung des Serumeiweißes mittels Invertseife, Schw. Med. Wschr., *81*, 2 (1951)

Albanese, A., Saur, B., und Isby, V.: J. Lab. Clin. Med., *32*, 296 (1947); J. Biol. Chem., *166*, 231 (1946)

Autenrieth, W.: Münch. Med. Wschr., *62*, 1417 (1915)

Beltombe, J., und Bandimont, R.: J. Pharmacie Belg., *50*, 211 (1950)

Berg, R.: Eiweißbedarf u. Mineralstoffwechsel bei einfachster Ernährung, Leipzig (1931)

Bright, R.: Rep. of Medical Cases, London, I (1899)

Burger, K.: Lehrbuch der Geburtshilfe, Springer (1950)

Chinard, F. P.: Interactions of quaternary Ammonium Compounds and Proteins. A simple method for the rapid estimation of urinary protein concentrations with Alkyldimethylbenzylammonium compounds. The Journal of Biol. Chem., *176*, 3, 1439 (1948)

Domagk, G.: Zitiert nach Stangegärd, Salmonsen encyclopaedia Journal, *1*, 14 (1953)

Doxiades, Goldfink und Cole: Lancet, *263*, 1242 (1952)

Dubrauszky, V., und Ott, E.: Der Einfluß der Spätschwangerschaftstoxikose auf das kindliche Schicksal, Geburtshilfe und Frauenheilkunde, *7/8*, 376 (1948)

Esbach, G.: C. R. Soc. Biol., *1*, 33 (1874); Berl. Klin. Wschr., *23*, 117 (1886)

Fahr, Th.: Die pathol. anat. Veränderungen der Nieren und Leber bei Eklampsie, in Hinselmann: „Die Eklampsie" (1924); Pathologie des Morb. Brightii, Handbuch der spez. path. Anatomie, Henke-Lubarsch, *VI/2*, Berlin (1933)

Folin, O., und Denis, W.: J. Biol. Chem., *18*, 273 (1914)

Franke, H.: Klinische Laboratoriumsmethoden, Berlin (1952)

Gunton, R., und Burton, A. C.: J. clin. Invest., *26*, 892 (1947)

Hallmann, L.: Klinische Chemie und Mikroskopie, Stuttgart, 6 (1952)

Haurowitz, F., und Tekman, S.: Bioch. Biophysica Acta, New York, *1*, 484 (1947)

Hiller, A., McIntosh, J. F., und Slyke, D. D. van: J. clin. Invest., *4*, 235 (1927)

Hiller, A., Greif, R. L., und Beckmann, W. W.: J. Biol. Chem., *176*, 1421 (1948)

Hiller, A., Plazin, J., und Slyke, D. D. van: J. Biol. Chem., *176*, 1401 (1948)

Hinsberg-Lang: Medizinische Chemie, Urban und Schwarzenberg, München (1951)

Hinsberg, K.: Chemische Bestimmungsmethoden in Klinik, Labor und ihre Auswertung in der Praxis, München (1952)

Hoff, F.: Klinische Physiologie und Pathologie, Stuttgart (1953)

Hoppe-Seyler: Handb. d. physiol. u. pathol. chem. Analyse für Ärzte, Biologen und Chemiker, 10, Berlin (1953)

Jolles, A.: Zeitschr. analyt. Chem., *41*, 589 (1902)

King, E. J.: Bioch. J., *48*, 50 (1950)

King, E. J., und Gronbeck, Ch.: Plasma, Milano, *1*, 27 (1954)

Korányi, A.: Die Eiweißkörper des Blutplasmas, Monographie, Dresden (1938); Plasmaeiweißkörper und Albuminurie, Monographie, Szeged (1938)

Kremling, H.: Über die Ätiologie der Schwangerschaftstoxikosen, Gynaecologia, *136*, 4, 203 (1953)

Lambert, J. M.: J. Colloid Sc., *2*, 479 (1947)

Lange, B.: Kolorimetrische Analyse, Weinheim (1952)

Lawrence, C. A.: Surface-active quaternary ammonium germicides, New York (1950)

Lenenberger, E.: Methodik im klinischen Laboratorium, Bern (1945)

Lenk, H.: Zitiert aus Taschenbuch der prakt. Medizin, Diagnostische Technik, Stuttgart, Thieme (1953)

Lieben, F.: Geschichte der physiol. Chemie, Deuticke, Leipzig-Wien (1935)

Luetscher, J. A. jr.: J. clin. Invest., *20*, 99 (1941)

Macheboeuf, M., Lacaille, P., und Rebeyrotte, P.: Bull. Soc. Clin. Biol., *29*, 402 (1947)
Marx, H.: Arzt und Laboratorium, Stuttgart, 6 (1947)
Menock, J. R., und Johns, R. G. S.: Biochem. J., *47*, 31 (1942)
Minz, B.: Praktikum d. klin. chem. mikrosk. u. bakt. Untersuchungsmethoden, Tillmanns-Ohnesorge, Urban und Schwarzenberg, Berlin-Wien 170 (1944)
Mörner, K. A. H.: Skand. Arch. Physiol., *6*, 332 (1895)
Neubauer-Huppert: Analyse des Harns, Wiesbaden, II (1913)
Onyx: Onyx Technical Data Sheets, Onyx Oil and Chemical Comp., Jersey City 2, N.J.
Pankhurst, K. G. A., und Smith, R. C. M.: Trans. Faraday Soc., *40*, 565 (1944)
Peters, J. P.: Quantitative Clinical Chemistry, Baltimore (1946)
Pfannkuch, E., und Kausche, G. A.: Biochem. Z., *312*, 72 (1942)
Phillipps, R. A., und Slyke van: Nach M. Reiser zitiert aus Dtsch. Med. Wschr. 532 (1948)
Polonovski, J., und Macheboeuf, M.: Ann. Anst. Pasteur, *74*, 196 (1948)
Prill, H. J., und Knopp, K.: Die Beeinflussung der Proteinurie der Schwangerschaftsspättoxikosen durch einen fieberhaften Infekt, Zentralbl. f. Gyn., *77*, 32, 1249 (1955)
Putnam, F., und Neurath, H.: J. Amer. Chem. Soc., *66*, 1992 (1944)
Roberts-Stolnikoff, Hammarsten, O., und Brandenberg, J.: Lancet, 1313 (1876); Jahresber. f. Tierchem., *6*, 148 (1877); Jahresber. f. Tierchem., *10*, 265 (1881)
Rose, F.: Poggendorffs Ann., *28*, 132 (1833)
Rosenmund, K., und Vogt, H.: Kleine Einführung in die pharm. und klin. Chemie, Wolfenbüttel (1947)
Rosenstein, S.: Die Pathologie und Therapie der Nierenkrankheiten. Advances in Protein Chemistry, New York (1948)
Ruppert, F.: Durchführung und Bewertung von Harneiweißproben, Ärztl. Lab., *1*, 2, 71 (1955)
Sarre, H.: Dtsch. Med. Wschr., *79*, 1652 (1954)
Sandkühler, St.: Über Proteinurie, Ärztl. Lab., *1*, 2, 51 (1955)
Schiff, H.: Berl. Ber., *29*, I, 298 (1896); Ann. Chem. Pharm., *299*, 236 (1897); Ann. Chem. Pharm., *319*, 300 (1901)
Schmidt, K. H.: Z. physiol. Chem., *277*, 177 (1942)
Schneider, G.: Z. physiol. Chem., *283*, 112 (1948)
Schulz, H., und Christensen, A.: Die Lehre vom Harn, Handbuch, Dr. W. Leube, Berlin (1882)
Slyke, D D. van, Hiller, A., Phillipps, R. H., Hamilton, P. B., Doll, V. P., Archibald, R. M., und Eder, H. A.: J. Biol. Chem., *183*, 331 (1950)
Stangegärd, S.: Salmonsen encyclopaedia Journal, *1*, 14 (1953)
Starlinger und Hartl: Biochem. Z., *160*, 129 (1925)
Steingold, L., Wood, J. H. F., und Finch, W. E.: Observations on the Desinfection of Hospital blankets with quaternary ammonium compounds during Laundering, Journal of Applied Bact., *1*, 159 (1954)
Spaeth, E.: Die chemische und mikroskopische Untersuchung des Harns, Barth, Leipzig, V (1924)
Tillmanns, J., und Ohnesorge, G.: Praktikum d. klin., chem., mikrosk. und bakt. Untersuchungsmethoden, 15; Urban und Schwarzenberg, Berlin-Wien (1944)
Valko, E. J.: Ann. New York Acad. Sc., *46*, 451 (1946)
Veale, H., und Vogel, J.: Die Lehre vom Harn, Handbuch; Dr. W. Leube, Berlin (1882)
Volhard, F.: Nierenerkrankungen und Hochdruck, Leipzig (1942)
Wollheim, E.: Verhandlungen der Deutschen Ges. f. inn. Med., 58. Kongreß 1952, XXV. Über die tubulären Funktionsstörungen der Niere, 211—216 (1952); Sonderabdruck J. F. Bergmann, München

LEBENSLAUF

Am 11. März 1927 wurde ich in Ellwangen an der Jagst als zweiter Sohn des Bürgermeisters Heinrich Blanz und seiner Ehefrau Emma, geb. Dengler, geboren.

Nach der Grundschule besuchte ich von 1938 bis zu meiner Einberufung im Dezember 1944 die Karls-Oberschule in Stuttgart. Im Juli 1946 legte ich an der Hellenstein-Oberschule in Heidenheim an der Brenz die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1947 begann ich an der Philosophisch-Theologischen Hochschule in Dillingen an der Donau Medizin zu studieren und legte im April 1950 in Würzburg die Ärztliche Vorprüfung und im Juni 1954 das Staatsexamen ab.

Nach vorübergehender ärztlicher Tätigkeit am Kreiskrankenhaus in Ochsenfurt am Main und in einer ärztlichen Allgemeinpraxis arbeite ich seit 15. Mai 1955 an der Universitäts-Frauenklinik in Würzburg.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Helmut Blanz

J. M. Richter's Buch- und Steindruckerei, Würzburg